第 33 卷 第 3 期 昆 虫 学 报 Vol. 33, No. 3
1990 年 8 月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Aug., 1990

三种鳞翅目幼虫肠道蛋白水解酶的活性*

白 成 沙槎云
（中国科学院动物研究所，北京）

摘要 本工作以酪蛋白为底物，测定粘虫 *Mythimna separata* Walker、棉铃虫 *Heliothis armigera* Hübner 和大蜡螟 *Galleria mellonlla* Linnaeus 三种鳞翅目幼虫肠道蛋白水解酶的活性，并分别用 BTEE 和 TAME 为底物，测定了其中类胰凝乳蛋白酶和类胰蛋白酶的活性。结果表明：三种幼虫肠道都含有类胰凝乳蛋白酶和类胰蛋白酶。抑制剂 TPCK 可以部分地抑制类胰凝乳蛋白酶的活性，而胰酶抑制剂则显著地抑制类胰蛋白酶的活性。

关键词 粘虫 棉铃虫 大蜡螟 蛋白水解酶 类胰凝乳蛋白酶 类胰蛋白酶

昆虫幼虫肠道蛋白水解酶是由肠壁细胞分泌的。关于苏芸金杆菌*Bacillus thuringiensis* Berliner 晶体蛋白毒素对鳞翅目幼虫作用方式的研究结果表明晶体蛋白在幼虫肠道内的水解与蛋白酶的活性密切相关（Lecadet 等，1966 a、b；Murphy，1973；Lilley 等，1980；仇序佳和雷群邦，1986）。我们过去一系列的研究结果已经证实了粘虫 *Mythimna separata* Walker 肠道蛋白水解酶在苏芸金杆菌肯尼亚变种“7404”晶体致病中的作用，初步提纯的粘虫蛋白水解酶在一定的条件下可以水解纯化后的晶体；同时将几种昆虫肠道蛋白酶对苏芸金杆菌晶体的水解作用速度进行了比较(沙槎云等，1981；沙槎云和白成，1982)。白成和沙槎云(1989)对粘虫幼虫蛋白水解酶的一些生化特性进行了研究。

粘虫，棉铃虫 *Heliothis armigera* Hübner 和大蜡螟 *Gailleria mellonella* Linnaeus 是三种危害性严重的害虫。为了采取更好的防治措施，应该深入了解清楚幼虫肠道酶类组成和含量。一些研究者先后对大菜粉蝶 *Pieris brassicae* L.，家蚕 *Bombyx mori* L.，胡蜂属 *Vespa* L.、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* L. 等昆虫的蛋白水解酶、类似物如“类胰凝乳蛋白酶和类胰蛋白酶”的测定方法进行了研究，有的还测定了这些酶的组成和含量（Hummel，1959；Scollelimann 等，1962；Ahmad 等，1976；Eguchi 等，1976；Grogan 等，1977；Kunz，1978）。但至今还未见对粘虫、棉铃虫和大蜡螟类胰凝乳蛋白酶和类胰蛋白酶活性的测定报道。

本文作者使用上述三种鳞翅目幼虫的 4 种肠道酶样品，分别选用三种不同的底物，测定了三种酶的活性，并且用 TPCK 和大豆胰蛋白酶抑制剂分别测定了对类胰凝乳蛋白酶和类胰蛋白酶活性的抑制效应。作者试图从每种昆虫肠道蛋白酶活性的不同，说明它们对苏芸金杆菌晶体内毒素敏感性的差异。

本文于 1988 年 3 月收到。
* 本研究是中国科学院基金项目。
中国科学院动物研究所冯喜昌解剖棉铃虫，张书方和谢墨江供给大蜡螟和粘虫，在此一并致谢。

材 料 和 方 法

一、实验材料

1. 供试昆虫

（1）粘虫幼虫以玉米叶或者小麦叶在室内 28℃下饲养。

（2）棉铃虫和大蜡螟幼虫分别用不同的人工饲料在室内 28℃下饲养。

2. 试剂

（1）N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯（BTEE），*P*-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯（TAME）和 L-甲苯磺酰氨基-2-苯乙基氯甲基酮（TPCK）为 Sigma 公司产品。

（2）胰蛋白酶抑制剂为 Boehringer Mannheim GmbH 产品。

二、方法

1. 样品的制备

（1）粘虫返吐液的离心上清液　轻压 5 龄早期粘虫幼虫腹部，将口中吐出的肠液收集在预冷的容器中，然后以 10000 转/分离心 30 分钟去沉淀，上清液作为酶原，在－20℃冰箱中保存备用。

（2）棉铃虫中肠匀浆物的离心上清液和沉淀　解剖 5 龄棉铃虫幼虫，摘取和收集中肠(包括肠内含物)，然后加入 pH 4.4 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液少许，用预冷的玻璃匀浆器手工匀浆 10 分钟，再加入同样的柠檬酸缓冲液，体积比为 1:20，静置 15 分钟，在 4℃下以 30000 转/分离心 1 小时。离心后上清液部分用蔗糖反透析浓缩至原体积的 1/4，在 4℃下用 pH 8.0 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液透析，然后分装；沉淀部分用同样的 Tris-HCl 缓冲液悬浮，体积比为 1:5。离心后浓缩的上清液和悬浮的沉淀作为酶原，分别在－20℃下保存备用。

（3）大蜡螟幼虫中肠匀浆物　解剖 5 龄大蜡螟幼虫取出中肠，加入少量 pH 8.0 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液，用玻璃匀浆器匀浆后，再加入同样的缓冲液，体积比为 1:5，匀浆物作为酶原在－20℃下保存备用。

2. 蛋白质浓度测定　采用 Lowry 等 (1951) 的方法，以酪蛋白为标准蛋白。

3. 蛋白水解酶活性的测定　具体测定步骤同前(沙槎云等，1981)。以酪氨酸为标准作为酶的活性指标。反应底物是酪蛋白。

4. 类胰凝乳蛋白酶活性的测定　主要按照 Grogan 等 (1977) 的方法进行，用胰凝乳蛋白酶作为参考。

5. 类胰蛋白酶活性的测定　按照 Grogan 等 (1977) 的方法，有部分修改，测定用的缓冲液中含有 30 mmol/L $CaCl_2$，反应时间是 15 分钟。参考大豆胰蛋白酶的反应曲线。

6. TPCK 以及胰蛋白酶抑制剂对类胰凝乳蛋白酶和类胰蛋白酶活性的影响　把 0.1 ml 酶液与等量抑制剂液混合，再加入缓冲液，混匀后于 37℃下预反应 10 分钟，之后接入底物反应，再测定反应产物的光密度值，经计算作图比较。

结　　果

1. 蛋白水解酶活性

用三种幼虫的4个蛋白水解酶样品来测定蛋白质含量和蛋白水解酶的活性。表1列出粘虫幼虫返吐液离心上清液、棉铃虫中肠匀浆物离心上清液和沉淀悬浮物，以及大蜡螟中肠匀浆物的蛋白水解酶的比活力分别是196、54、109和74（酶单位/毫克蛋白）。可见，采用本实验样品制备方法而制备的棉铃虫中肠匀浆物离心淀沉悬浮物酶的比活力（109）高于浓缩的离心上清液（54），这说明棉铃虫幼虫中肠组织内含有丰富的蛋白水解酶。

表1 三种幼虫4个制品肠道蛋白含量和蛋白水解酶的活性

样品	蛋白含量（毫克/毫升）	蛋白水解酶			
		光密度值	稀释倍数	酶活性（酶单位/毫升）	比活力（酶单位/毫克蛋白）
粘虫返吐液离心上清液	46.0	0.308	×75	9000	196
棉铃虫中肠匀浆物离心上清液	11.4	0.105	×15	620	54
棉铃虫中肠匀浆物离心沉淀	57.0	0.220	×75	6250	109
大蜡螟中肠匀浆物	22.6	0.070	×50	1666	74

2. 类胰凝乳蛋白酶和类胰蛋白酶活性

以 TAME 或者 BTEE 作为酶反应底物，分别与4个幼虫酶样品反应，可以间接测出类胰凝乳蛋白酶和类胰蛋白酶的相对活性。正如表2所示，上述4个酶样品都含有这两种酶，相对比活力大小顺序与表1所列的蛋白水解酶的比活力顺序是一致的。

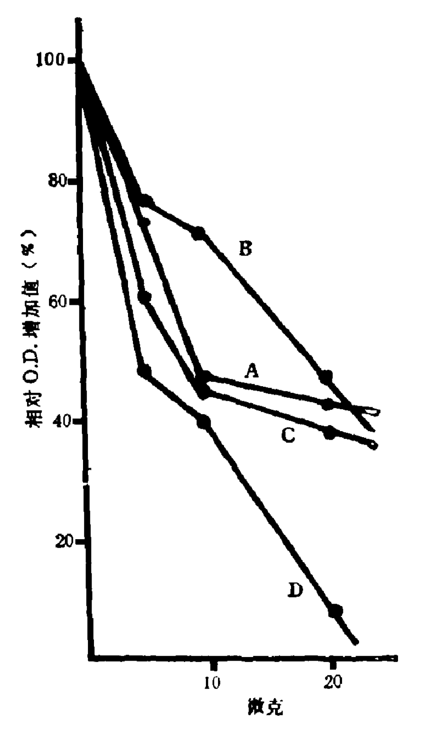


图1 TPCK 对类胰凝乳蛋白酶活性的影响
A. 粘虫返吐液离心上清液（稀释250倍）
B. 棉铃虫中肠匀浆物离心上清液（稀释10倍）
C. 棉铃虫中肠匀浆物离心沉淀（稀释100倍）
D. 大蜡螟中肠匀浆物（稀释50倍）

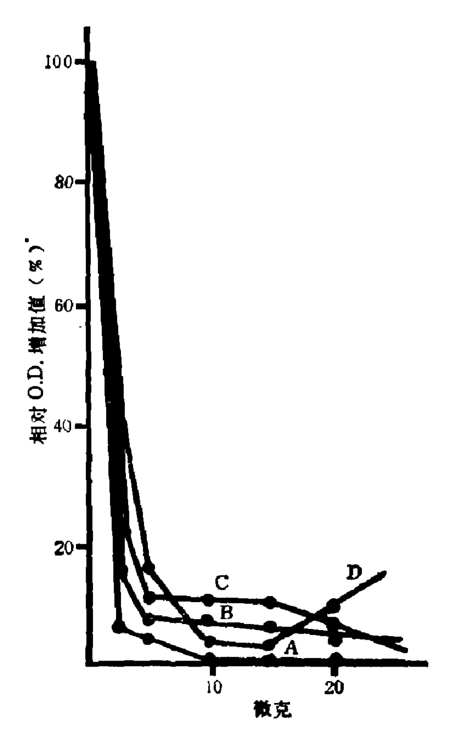


图2 大豆胰蛋白酶抑制剂对类胰蛋白酶活性的影响
A. 粘虫返吐液离心上清液（稀释200倍）
B. 棉铃虫中肠匀浆物离心上清液（稀释20倍）
C. 棉铃虫中肠匀浆物离心沉淀（稀释100倍）
D. 大蜡螟中肠匀浆物（稀释20倍）

表 2 三种幼虫 4 个制品肠道类胰凝乳蛋白酶和类胰蛋白酶的活性*

样品	类胰凝乳蛋白酶				类胰蛋白酶			
	光密度值	稀释倍数	酶活性（酶单位/毫升）	比活力（酶单位/毫克蛋白）	光密度值	稀释倍数	酶活性（酶单位/毫升）	比活力（酶单位/毫克蛋白）
粘虫返吐液离心上清液	0.300	×250	4800	104	0.093	×200	4100	89
棉铃虫中肠匀浆物离心上清液	0.414	×10	256	23	0.013	×50	150	13
棉铃虫中肠匀浆物离心沉淀	0.481	×100	3200	56	0.078	×200	3000	53
大蜡螟中肠匀浆物	0.150	×100	1040	46	0.036	×100	600	27

* 参考标准胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶活性曲线进行计算的相对酶活性。

3. TPCK 对类胰凝乳蛋白酶活性的抑制作用

从图 1 显示可知四个酶样品中的类胰凝乳蛋白酶的活性可以被适量的 TPCK 抑制，随着抑制剂量的增加，酶活性逐步下降，二者成反比关系。大蜡螟中肠匀浆物酶活性抑制曲线下降的趋势比其他样品曲线下降得快，可能是所用样品中含该酶量少所致。

4. 胰酶抑制剂对类胰蛋白酶活性的抑制作用

使用胰酶抑制剂去抑制类胰蛋白酶的活性，从图 2 结果来看抑制作用非常显著。即使采用低剂量的抑制剂，如 5 μg，也能显著的抑制酶的活性。如果采用过量抑制剂去抑制大蜡螟中肠匀浆物的酶活性，则对实验有所干扰。

讨 论

昆虫幼虫肠道蛋白酶类的组成和含量，与昆虫本身和取食食物种类密切相关。Lecadet 等（1966a、b）认为大菜粉蝶幼虫至少有两种蛋白酶，它们的性质类似于胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶。本研究结果肯定了粘虫、棉铃虫和大蜡螟幼虫肠道都含有类胰凝乳蛋白酶和类胰蛋白酶。通过 TPCK 和胰酶抑制剂分别对这两种酶的抑制实验，证明它们都有胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶的一些特性。

在一些昆虫幼虫肠道中，大分子的苏芸金杆菌晶体蛋白质前毒素被蛋白水解酶水解后，释放出来蛋白多肽毒素。一些毒素进入肠壁，使幼虫染病或死亡。粘虫和棉铃虫对许多变种的苏芸金杆菌晶体毒素比大蜡螟敏感，本实验测知它们肠道蛋白水解酶的比活力，前二者的比活力比后者高。进一步推论，可以认为肠道蛋白酶的含量越多，比活力越高，那么在单位时间内消化摄入的苏芸金杆菌晶体的速度越快，释放出来的晶体蛋白毒素使幼虫致病的时间缩短。这种结果可以用来阐明这三种幼虫种间对蛋白毒素耐受性的差异。

参 考 文 献

白 成、沙槎云 1989 粘虫幼虫肠道蛋白水解酶特性的研究。昆虫学报 32(1)：22—5。
仇序佳、雷群邦 1986 苏芸金杆菌以色列变种的晶体及其对蚊幼虫中肠蛋白酶活性的影响。昆虫学报 29(2)：126—30。
沙槎云、白 成 1982 昆虫肠道蛋白酶对苏芸金杆菌晶体作用的比较 昆虫学报 25(3)：244—9。
沙槎云、白 成、温 洁 1981 粘虫肠道蛋白酶在苏芸金杆菌肯尼亚变种"7404"晶体致病中的作用。昆虫学报 24(3)：237—43。

Ahmad, Z. et al. 1976 Alkaline protease in the larvae of armyworm, *Spodoptera litura*. *Insect Biochem.* **6**: 501—5.

Eguchi, M. & Iwamoto, A. 1976 Alkaline protease in the midgut tissue and digestive fluid of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **6**: 491—6.

Grogan, D. E. & Hunt, J. H. 1977 Digestive proteases of two species of wasps of the genus *Vespula*. *Insect Biochem.* **7**: 191—6.

Hummel, B. C. W. 1959 A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can. J. Biochem. Physio.* **37**: 1393—9.

Kunz, P. A. 1978 Resolution and properties of the proteinases in the larvae of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem.* **8**: 43—51.

Lecadet, M. M. & Dedonder, R. 1966a Les protease de *Pieris brassicae*. Purification et protrietes. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **48**: 631—60.

Lecadet, M. M. & Dedonder, R. 1966b Les protease de *Pieris brassicae*. Speificite. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **48**: 661—91.

Lilley, M et al. 1980 Purification of the insecticidal toxin in crystals of *Bacillus thuringiensis*. *J. Gen. Microbiol.* **118**: 1—11.

Murphy, D. W. 1973 The role of midgut proteases in determining the relative resistance of 3 susceptible species of lepidopterous larvae to the δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Thesis Univ. of Califonia, Riverside.

Schoellmann, G. & Shaw, E. 1962 Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin. *Biochemistry* **2**(2): 252—5.

ACTIVITIES OF DIGESTIVE PROTEASES OF THREE SPECIES OF LEPIDOPTEROUS LARVAE

BAI CHENG SHA CHA-YUN

(Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing)

The activities of digestive proteases of larvae of *Mythimna separata*, *Heliothis armigera* and *Galleria mellonella* were determined by using casein as the substrate. The activities of chymotrypsin-like and trypsin-like enzymes were also determined with their specific substrates. The results showed that all the preparations from the larval intestines contained chymotrypsin-like and trypsin-like enzymes. The inhibitory actions of TPCK on the chymotrypsin-like enzyme and trypsin-inhibitor on the trypsin-like enzyme were also studied

Key words *Mythimna separata*——*Heliothis armigera*——*Galleria mellonella*——protease——chymotrypsin——trypsin